

**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



<b>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>6</sup> :</b> <b>C07K 16/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer:</b> <b>WO 98/54225</b>  <b>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:</b> 3. Dezember 1998 (03.12.98)		
<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"><tr><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01499 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Mai 1998 (28.05.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 22 888.7      28. Mai 1997 (28.05.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HÜNIG, Thomas [DE/DE]; Mittlere Heerbergstrasse 26, D-97078 Würzburg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TACKE, Michael [DE/DE]; Birkenstrasse 33, D-82377 Penzberg (DE). HANKE, Thomas [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HANKE, Gabriele [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HARA, Toyomichi [JP/DE]; Steinheilstrasse 29, D-97070 Würzburg (DE). RODRIGUEZ-PALMERO, Marta [ES/DE]; Fröhlichstrasse 9, D-97082 Würzburg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> JUNGBLUT, Bernhard; Fitzner, Münch &amp; Jungblut, Habersaathstrasse 58, D-10115 Berlin (DE).</td><td style="width: 50%; vertical-align: top;"><b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i></td></tr></table>			<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01499 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Mai 1998 (28.05.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 22 888.7      28. Mai 1997 (28.05.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HÜNIG, Thomas [DE/DE]; Mittlere Heerbergstrasse 26, D-97078 Würzburg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TACKE, Michael [DE/DE]; Birkenstrasse 33, D-82377 Penzberg (DE). HANKE, Thomas [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HANKE, Gabriele [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HARA, Toyomichi [JP/DE]; Steinheilstrasse 29, D-97070 Würzburg (DE). RODRIGUEZ-PALMERO, Marta [ES/DE]; Fröhlichstrasse 9, D-97082 Würzburg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> JUNGBLUT, Bernhard; Fitzner, Münch & Jungblut, Habersaathstrasse 58, D-10115 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
<b>(21) Internationales Aktenzeichen:</b> PCT/DE98/01499 <b>(22) Internationales Anmeldedatum:</b> 28. Mai 1998 (28.05.98)  <b>(30) Prioritätsdaten:</b> 197 22 888.7      28. Mai 1997 (28.05.97)      DE  <b>(71)(72) Anmelder und Erfinder:</b> HÜNIG, Thomas [DE/DE]; Mittlere Heerbergstrasse 26, D-97078 Würzburg (DE).  <b>(72) Erfinder; und</b> <b>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):</b> TACKE, Michael [DE/DE]; Birkenstrasse 33, D-82377 Penzberg (DE). HANKE, Thomas [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HANKE, Gabriele [DE/US]; 2456 Hilgard Avenue #605, Berkeley, CA 94709 (US). HARA, Toyomichi [JP/DE]; Steinheilstrasse 29, D-97070 Würzburg (DE). RODRIGUEZ-PALMERO, Marta [ES/DE]; Fröhlichstrasse 9, D-97082 Würzburg (DE).  <b>(74) Anwalt:</b> JUNGBLUT, Bernhard; Fitzner, Münch & Jungblut, Habersaathstrasse 58, D-10115 Berlin (DE).	<b>(81) Bestimmungsstaaten:</b> AL, AM, AU, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CU, CZ, EE, GE, HU, ID, IL, IS, JP, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LV, MD, MG, MK, MN, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, US, UZ, VN, YU, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>			
<b>(54) Title:</b> HUMAN-CD28 SPECIFIC MONOCLONAL ANTIBODIES FOR ANTIGEN NON-SPECIFIC ACTIVATION OF T-LYMPHOCYTES  <b>(54) Bezeichnung:</b> HUMAN-CD28 SPEZIFISCHE MONOKLONALE ANTIKÖRPER ZUR ANTIGENUNSPECIFISCHEN AKTIVIERUNG VON T-LYMPHOZYTEN  <b>(57) Abstract</b> <p>The invention relates to human-compatible monoclonal antibodies, which are specific against human-CD28 and which activate non-specifically human-T-lymphocytes of several to all sub-groups without occupying an antigen receptor of said human-T-lymphocytes.</p> <b>(57) Zusammenfassung</b> <p>Die Erfindung lehrt humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche gegen Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.</p>				

**EINGEGANGEN**

11.11.98

DRES. FITZNER, MÜNCH & JUNGBLUT  
BERLIN

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur  
antigenunspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten

5 Beschreibung:

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und somit antige-  
10 unspezifisch aktivieren, Hybridomzellen zur Herstellung solcher Antikörper, ein Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper sowie Verwendungen solcher Antikörper. - Als monoklonale Antikörper sind Antikörper bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen) produziert werden, die  
15 durch Fusion einer Antikörper produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden sind. Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und tierischer Herkunft expri-  
miertes Zelloberflächenmolekül bekannter Aminosäuresequenz  
20 bezeichnet, dem im Rahmen der internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das Kürzel CD28 gegeben wurde. Mit Aktivierung von T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselaktivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die  
25 Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den beschriebenen  
30 Begleiterscheinungen ist Teil der physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten (lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein (Immundefizienz).

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung von Antigenen, z. B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie des auf allen ruhenden T-Zellen gleichermaßen exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der "Kostimulation" der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten monoklonalen Antikörpern. Im klassischen System der Kostimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Monoklonale Antikörper der eingangs genannten Art sind bekannt. Eine "direkte", d. h. von der Besetzung des Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische monoklonale Antikörper, wurde in folgenden Systemen beobachtet: in der Literaturstelle Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106 wurde gezeigt, daß ein sehr kleiner Anteil (5 %) menschlicher T-Lymphozyten, die den für ruhende T-Lymphozyten typischen Oberflächenmarker CD45 RO tragen, durch den "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper 9.3 bei Zusatz des Wachstumsfaktors Interleukin-2 (IL-2) ohne Besetzung des Antigenrezeptors aktiviert wird. In der Arbeit von Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, wurde gezeigt,

- daß ein auf konventionellem Wege, d.h. durch Immunisierung von Mäusen mit menschlichen T-Zellen, hergestellter CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper in Zellkultur eine Untergruppe menschlicher T-Zellen ohne Besetzung des
- 5 Antigenrezeptors zur Proliferation aktivieren kann, wenn CD28 durch diesen monoklonalen Antikörper besetzt wird und die zellgebundenen monoklonale Antikörpermoleküle zusätzlich durch weitere Antikörper miteinander vernetzt werden. In beiden Fällen sind die beschriebenen Antikörper zunächst
- 10 grundsätzlich nicht zum Einsatz in der Humanmedizin geeignet, da es sich um Maus Antikörper handelt. Weiterhin ist beiden beschriebenen Antikörpern gemeinsam, daß nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen "direkt" aktivierbar ist.
- 15 In der Arbeit von Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247 wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: "klassische Antikörper", die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger
- 20 Besetzung des Antigenrezeptors kostimulieren; und "direkte", die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte monoklonale Antikörper rühren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf
- 25 denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete unterschiedlichen Selektionen erhältlich. Ferner wird in dieser Literaturstelle gezeigt, daß CD28-spezifische monoklonale Antikörper, die den direkt aktivierenden Effekt besitzen,
- 30 viel langsamer als klassische CD28-spezifische monoklonale Antikörper an T-Lymphozyten binden; die Bindung an eine Mausfibroblasten-Zelllinie (L-929), an deren Oberfläche das CD28-Molekül künstlich durch Transfektion exprimiert wird, erfolgt jedoch für klassische und "direkt" stimulierende

CD28-spezifische monoklonale Antikörper mit der gleichen Geschwindigkeit. Daraus wird gefolgert, daß die insofern bekannten "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper eine aktive Form des CD28-Moleküls  
5 erkennen, deren Vorliegen auf ruhenden T-Zellen durch einen bisher unbekannten Mechanismus unterdrückt wird, die aber bei Expression des Moleküls in nicht-T Tumorzelllinien zugänglich ist. Die insofern bekannten monoklonalen Antikörper sind jedoch einerseits gegen Ratten-CD28 spezifisch und  
10 andererseits Maus-Antikörper. Sie eignen sich daher aus beiden Gründen nicht für therapeutische Zwecke beim Menschen.

Gegenüber dem Stand der Technik gemäß der beiden erstgenannten Literaturstellen liegt der Erfindung das technische  
15 Problem zugrunde, "direkte" Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur Verfügung zu stellen, die zum einen auch humanverträglich sind und die zum anderen Human T-Zellen in breitem Umfang zu aktivieren vermögen.

20 Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch ak-  
25 tivieren, vorzugsweise mit humanen konstanten Komponenten. - Konstante Komponenten eines Antikörpers sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeutsam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante Komponenten unterscheiden  
30 sich jedoch bei Antikörpern verschiedener Arten und folglich auch Tieren und Menschen. Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den Antikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein. Erfindungsgemäße monoklonalen Antikörper

sind daher einerseits humanverträglich, sei es per se oder durch Humanisierung und können andererseits zur Behandlung verschiedener Krankheiten, die auf zu geringer T-Lymphozyten-Aktivität beruhen, dienen, da die Antikörper gegen Human-CD28 5 spezifisch sind und da die Aktivierung der T-Lymphozyten umfassend ist.

Unter die Erfindung fallen selbstverständlich verschiedenste Derivate von monoklonalen Antikörpern, sofern die beanspruch- 10 ten Merkmale erfüllt sind. Unter Derivaten von monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklonalen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche biochemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humanisierung eines monoklonale Antikörpers 15 der Maus durch partiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen.

Im einzelnen sind erfindungsgemäße monoklonale Antikörper 20 erhältlich durch: A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe 25 A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sez- 30 ernierung der Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der Antikörper daraus oder Produktion der Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere. - Der Kern der Erfindung besteht

gegenüber den nächstliegenden Literaturstellen Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106, und Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, demnach in der Erkenntnis, daß eine "direkte" Aktivierung praktisch aller T-Lymphozyten dann erreichbar ist, wenn die monoklonalen Antikörper durch Immunisierung mit nicht-T Tumorzellen, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, erhalten sind, anstelle einer Immunisierung mit T-Zelllinien. Denn so können monoklonale Antikörper erhalten werden, die nicht nur gegen Human-CD28 spezifisch sind, sondern auch eine "direkte" Aktivierung in beachtlichem Umfang bewirken. Im einzelnen weisen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls auf, die auf dem natürlicherweise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Besetzung durch die neuartigen monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt. Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper definiert wird.

20

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen, bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.

Im einzelnen ist es bevorzugt, wenn die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch a) Schaffung



eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH $\beta$ APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Pro-

5 toplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J

10 und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen (beispielsweise durch Injektionen 6 x i.p. und anschließend 1 x i.v.), f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit ("nonproducer"-,

15 d.h. keine Antikörper produzierenden) Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zel-

20 len binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden.

Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A. Aruffo und Dr.

25 B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B., 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der

30 Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pH $\beta$ APr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning,

P, et al., 1987, "A human  $\beta$ -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit  
5 von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezüglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171,  
10 verwiesen.

Gegenstand der Erfindung sind demnach auch gemäß Patentanspruch 4 Hybridomzellen sowie ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Antikörpern gemäß der Patentansprüche 5 und 6.

Von eigenständiger Bedeutung ist aber im Rahmen der Erfindung  
20 die Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie AIDS oder bei Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen, zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen und/oder zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine und Chemokine und ihre Rezeptoren, bei beispiel-  
25 sweise Autoimmunerkrankungen und AIDS. Die galenische Herichtung der Arzneimittel für die verschiedenen Verabreichungsformen ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Als Qualität der T-Zellreaktion ist insbesondere die Produktion bestimmter  
30

Zytokinmuster zu verstehen, die z.B. pro- oder anti-inflammatorisch wirksam sein können oder selektiv zur Produktion bestimmter Immunglobulinklassen in B-Lymphozyten führen können (klassische Beispiele für verschiedene Qualitäten der T-Zellreaktion sind die funktionellen TH1 und TH2 Phänotypen, wie folgend in Beispielen beschrieben). Die Erfindung umfaßt auch Verfahren zur Heilung der vorstehend und nachstehend genannten Krankheiten unter Verwendung erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper.

10

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. Insbesondere wird die Herstellung erfindungsgemäßer monoklonaler Antikörper beschrieben. In diesen Ausführungsbeispielen werden auch Screeningverfahren im einzelnen deutlich, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Aus den folgenden Beispielen werden auch erfindungsgemäße therapeutische Einsatzmöglichkeiten deutlich.

20

Die dargestellten Experimente bzw. die Beispiele zu den Wirkungen von "direkten" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt" aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar von der Firma Pharmingen, San Diego, USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen wird, auch im Hinblick auf Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.

## Beispiel 1

In diesem Beispiel wird die Herstellung erfindungsgemäßer,  
5 d.h. human-CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper näher  
erläutert. Diese werden folgend auch als CMY-2 bezeichnet.  
Human CD28 aus einer cDNA Bibliothek wurde in A20J und/oder  
L929 Zelllinien rekombinant exprimiert. Zunächst wurde hierzu  
ein Plasmid mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den  
10 pHßAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments  
geschaffen. Aus Escherichia coli (MC1061) wurden Protoplasten  
hergestellt, welche das Plasmid tragen. Dann erfolgte eine  
Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929  
Tumorzellen mittels Polyethylenglykol. Die so erhaltenen  
15 transfektierten Zellen wurden auf übliche Weise kultiviert.  
Anschließend erfolgte ein Screenen der transfektierten Maus  
A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28  
und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J  
und/oder L929 Zellen.

20

Der Nachweis der erfolgreichen Expression erfolgte mit Hilfe  
eines konventionellen, kommerziell erhältlichen fluores-  
zenzmarkierten Antikörpers mit Spezifität für Human CD28  
(9.3-Phykoerythrin). Als Negativkontrolle wurden nicht trans-  
25 fizierte A20J- bzw. L929-Zellen mit dem gleichen Antikörper  
gefärbt. Die Transfektanten (A20J-CD28 und L929-CD28) zeigten  
eine höhere Fluoreszenzintensität. Da nicht alle Zellen CD28  
positiv waren, wurden CD28-positive Zellen subkloniert und  
zur Immunisierung verwendet. Wie in Fig. 1 an der Ver-  
30 schiebung der Punktwolken nach oben in den beiden rechten  
Diagrammen erkennbar, reagierten diese Zellen mit dem  
käuferischen Antikörper, drückten also Human CD28 an ihrer  
Oberfläche aus.

Die A20J Human-CD28 Zelllinie wurde zur Immunisierung von BALB/c Mäusen verwendet. Zellfusion und screening wurden wie folgt durchgeführt: i) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J Zellen (Injektionen 6 5 x i.p. und anschließend 1 x i.v.). ii) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol. iii) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter 10 Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden.

Als read-out diente die Anfärbung einer Mischung aus CD28 transfizierten und untransfizierten Maus L929 Tumorzellen. 15 Fig. 2 zeigt, daß der auf diesem Weg isolierte monoklonale Antikörper CMY-2 transfizierte und untransfizierte Zellen durch unterschiedliche Fluoreszenzintensität unter- scheidet. Das differentielle Screening auf Antikörper gegen Human-CD28 erfolgte wie folgt. Je 50 µl Überstand von 20 kultivierten Zellhybridomen wurden entnommen und mit einem Gemisch aus L929-Zellen und L929-CD28-Transfektanten 15 min inkubiert. Nach dem Waschen wurden die Zellen mit DaMIg-PE angefärbt. Teil A zeigt die Negativkontrolle. Die Zellen wurden nur mit DaMIg-PE inkubiert. Teil B zeigt die Färbung 25 mit einem Überstand, der leicht positiv war, aber keinen Unterschied bei beiden Zellen zeigt. Teil C zeigt die mit einem Überstand von CMY-2 gefärbten Zellen.

In nicht dargestellten Experimenten wurden periphere 30 Blutzellen des Menschen mit dem neu isolierten CMY-2 und dem "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper 9.3 gefärbt. Es wurde ein identisches Expressionsmuster auf den Subpopulationen menschlicher Blutzellen gefunden.

Zusammengefaßt zeigen die Experimente, daß CMY-2 ein human CD28-spezifischer Antikörper ist.

CMY-2 wurde sodann mit aus peripherem Blut auf circa 80 %  
5 angereicherten menschlichen T-Lymphozyten auf klassische kostimulierende und auf "direkt" stimulierende Aktivität getestet. Die T-Zellproliferation wurde durch Einbau von <sup>3</sup>H-Thymidin zwischen dem 2. und 3. Tag der Kultur gemessen. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

10

Kostimulation:

Unstimulierte Zellen	276 cpm
CD3-spezifischer Antikörper	3111 cpm
15 CD3-spezifischer Antikörper + CMY-2	51676 cpm

Direkte Stimulation:

Solid-phase anti-mouse Ig	379 cpm
Solid-phase anti-mouse Ig + Kontroll-mAk	258 cpm
20 Solid-phase anti-mouse Ig plus CMY-2	19115 cpm

Zur Erläuterung: Anti-CD3 sorgt für T-Zellrezeptor-Stimulation (CD3 ist Teil des TCR-Komplexes). CMY-2 wurde in Form eines nicht aufgereinigten Kulturüberstandes (50%  
25 Endvolumen) verwendet. Erfahrungsgemäß ist die dabei zu erwartende effektive mAk-Konzentration suboptimal für eine direkte Aktivierung, aber ausreichend für die Kostimulation. Das Experiment zeigt, daß CMY-2 direkt aktivierende Eigenschaften hat.

30

Erfindungsgemäße Hybridomzellen, welche CMY-2 produzieren, sind bei der DSMZ, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Mascheroder Weg 1b, D-38124 Braunschweig, unter der Nummer DSM ACC2353 (20.05.1998) hinterlegt worden.

## Beispiel 2

5 In diesem Beispiel wird die immunmodulierende Wirkung von  
"direkten" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern näher  
erläutert. Zielrichtung der Experimente ist der Nachweis der  
Leitzytokine der TH2 Zellen, nämlich IL-4 und IL-10, als  
Folge der direkten Aktivierung in vitro und in vivo. IL-4 ist  
10 entscheidend für die Kooperation der TH2-Zellen mit  
B-Lymphozyten, für die Differenzierung weiterer CD4 T-Zellen  
zu TH2-Zellen und damit die Polarisierung des Immunsystems weg  
von der Entzündungs- und hin zur humoralen Immunreaktion, und  
IL-10 ist der zentrale Faktor für die Unterdrückung  
15 inflammatorischer (TH1) Reaktionen. Es sind nur die  
wichtigeren Ergebnisse der in vivo Behandlung von Ratten  
dargestellt. In vitro wurden sogar noch deutlichere Effekte  
gefunden.

20 Fig. 3 zeigt das exprimierte Zytokinprofil von Lymphknoten  
und Milzzellen junger LEW-Ratten drei Tage nach i. p.  
Injektion des direkt aktivierenden mAk JJ316, des  
Kostimulators JJ319, des TCR-spezifischen mAk R73 oder des  
Vehikels PBS. Die Darstellung ist ein sogenannter RNase  
25 Protektionstest, in dem radioaktiv markierte antisense  
mRNA-Proben durch Hybridisierung mit der aus dem Gewebe  
extrahierten RNA vor dem Abbau zugesetzter RNase geschützt  
werden. Diese geben auf dem Gel definierte Banden und  
erlauben, auf einen Blick das exprimierte Zytokinprofil auf  
30 mRNA Ebene eines Gewebes zu überblicken. Die beiden kleinsten  
Fragmente, L32 und GADPH, sind "Haushaltsgene", deren  
gleichförmige Expression zur Kontrolle gleich großer Mengen  
eingesetzter RNA in den einzelnen Ansätzen dient. Der Test

wurde mit einem kommerziell von der Firma Pharmingen erhältlichen Kit durchgeführt.

JJ316, aber nicht JJ319 oder R73, induzieren massiv IL-10  
5 und, in einem geringeren Ausmaß, IL-4 mRNA. Die Effekte sind in der Milz besonders deutlich, aber auch im Lymphknoten sichtbar.

In Fig. 4 wird das Zytokin IL-4 auf Protein- und gleichzeitig  
10 auf Einzelzellebene durch durchflußzytometrische Analyse nachgewiesen. Die Zellen werden zu diesem Zweck zunächst mit mAk gegen das Oberflächenmolekül CD4 gefärbt, dann fixiert und permeabilisiert, so daß in einer anschließenden zytoplasmatischen Färbung mit einem IL-4-spezifischen mAk,  
15 der mit einem zweiten Fluorochrom markiert ist, das IL-4 Protein nachgewiesen werden kann. Die Auswertung erfolgt im Durchflußzytometer, jeder Punkt stellt eine Zelle dar. Die eingeführten Quadranten stellen die Grenzen zwischen Hintergrund und positiver Reaktion dar. Die Methodik ist aber  
20 auch detailliert im Katalog der Firma Pharmingen beschrieben.

Wie die Fig. 4 zeigt, induziert die Injektion des mAk JJ316, nicht aber die des klassischen Kostimulators JJ319 die  
Produktion von IL-4 in einem substantiellen Anteil der  
25 isolierten CD4 T-Zellen.

In Fig. 5 wird eine biologische Auswirkung der erhöhten IL-4 Produktion gezeigt: Das Niveau an nachweisbaren Antikörpern der Klasse IGE steigt als Folge der Behandlung mit mAk JJ316  
30 deutlich an und belegt die in vivo Effektivität der von "direkten" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper induzierten IL-4 Sekretion.



Die Figuren 6 und 7 zeigen sogenannten EMSAs (Electrophoretic Mobility Shift Assays) zum Nachweis der Induktion von Transkriptionsfaktoren, die die Entwicklung von anti-inflammatorischen TH2-Zellen fördern. Die Technik ist folgende.

5 T-Zellen werden unterschiedlich lange in vitro stimuliert, dann werden die Proteine aus den Zellkernen in Lösung gebracht und mit einer radioaktiv markierten kurzen Gensonde inkubiert, deren Sequenz sie als Transkriptionsfaktoren erkennen sollten. Nach Inkubation wird das Gemisch auf einem  
10 Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die ungebundene markierte Gensonde läuft unten aus dem Gel heraus (hier nicht zu sehen). Banden wie die hier abgebildeten sind z. T. unspezifisch (überall vorhanden) oder selektiv induziert (starke, schwache Signale je nach Stimulus).

15

Aus der Betrachtung der Figuren 6 und 7 wird folgendes deutlich. Sowohl mit einer GATA3-spezifischen wie mit einer c-Maf-ResponseElement-spezifischen Probe zeigt sich verstärkte Induktion bei Kostimulation (TCR + classical CD28)  
20 sowie direkter Stimulation ("direct" CD28) im Vergleich zur Stimulation nur über den T-Zellrezeptor (TCR). Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Stimulation des CD28-Moleküls die Expression dieser Transkriptionsfaktoren im Zellkern fördert, und daß dies auch ohne TCR-Stimulation durch direkte  
25 CD28-Stimulation möglich ist. Zur Bedeutung dieser Faktoren für die Differenzierung von TH2-Zellen wird auf Current Opinion in Immunology 1997, 9:776-781, verwiesen.

Die vorstehend im einzelnen erläuterten Zusammenhänge zur  
30 immunregulierenden bzw. immunmodulierenden Wirkung "direkter" CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper hinsichtlich der Bildung von TH1 und/oder TH2 Zellen machen diese folglich besonders geeignet zur Herstellung von Arzneimitteln zur Behandlung von solchen Immunreaktionen abhängiger

Krankheiten. Dies sind grundsätzlich alle allergisch-inflammatorischen sowie autoimmun-inflammatorischen Krankheitsbilder. Zu ersterem gehören beispielsweise die unter der Bezeichnung "Inflammatory Bowel Disease" (IBD) zusammengefaßten entzündlichen Darmerkrankungen und Kontaktdermatitis. Zu letzterem gehören Typ I Diabetes und Multiple Sklerose. Auch ist zu erwarten, daß eine starke Stimulation des menschlichen CD28 Moleküls durch erfindungsgemäße monoklonale Antikörper in der Lage ist, HIV I infizierte T-Zellen zu heilen. Denn dadurch können von den Viren als zelluläre Korezeptoren benutzte Chemokinrezeptoren abgeschaltet und die Produktion von Chemokinen, die an solche Rezeptoren binden und sie damit für HIV I Viren blockieren, induziert werden.

15

### Beispiel 3

Fig. 8 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper (JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von GIBCO/BRL, enthaltend 5 % FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1 µCi/Ansatz für 16 Std., 1 Ci = 37 GBq, Bestimmung mit β-Detektor) bestimmt.

30

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, daß es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist,

diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonale Antikörper an sogenannte Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonale Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immunglobulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.

#### 15 Beispiel 4.

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten Organismus. Fig. 9 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren, werden ganz analoge Effekte erreicht. Dies kann dann insbesondere in Situationen Anwendung finden, in denen der Anteil von CD4 T-Zellen pathologisch erniedrigt ist und dem Normalniveau wieder angenähert werden soll. Solche Situationen sind insbesondere im Krankheitsbild von AIDS und nach Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation gegeben. Im vorliegenden Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen behandelt wurden. Die aufgrund der

Proliferationsstimulierung "überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische Mechanismen abgebaut.

## 5 Beispiel 5.

Wie aus den vorstehenden aus den Figuren 5 - 7 gezogenen Schlußfolgerungen zu erwarten, sind direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper therapeutisch  
10 einsetzbar, u.a. zur Verhinderung einer inflammatorischen Autoimmunreaktion. Fig. 10 zeigt ein Experiment hierzu, und zwar zur sogenannten Adjuvans Arthritis in der Ratte, einem Modellsystem für bestimmte Formen der rheumatoiden Arthritis beim Menschen. "Paw volume increase" gibt die Zunahme des  
15 Volumens der Pfoten an. "Days" steht für Tage. "Healthy"-Datenpunkte geben Werte für gesunde Tiere an. Zur Isotyp-Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse mit Spezifität für ein irrelevantes menschliches Zelloberflächenmolekül verwendet. AA steht für  
20 Adjuvans Arthritis. PBS steht für "phosphate buffered saline". W3/25 steht für einen monoklonalen Antikörper mit Spezifität für das CD4 Molekül der Ratte. Die Adjuvans Arthritis wird durch sogenannte TH1-Zellen vermittelt. TH1-Zellen entstehen aus ruhenden CD4 T-Zellen im Verlauf der  
25 Aktivierung unter dem Einfluß bestimmter löslicher Faktoren des Immunsystems, sogenannter Zytokine. Die Gegenspieler der TH1-Zellen sind die anti-inflammatorisch wirkenden TH2-Zellen, deren Entstehung durch andere Zytokine gesteuert wird. Bei dem in Fig. 10 und 11 gezeigten Versuch wurde die  
30 Entstehung der Adjuvans Arthritis, abgelesen an der Gelenkschwellung (Fig. 10) und dem arthritischen Index (Fig. 11) nach Immunisierung mit Mykobakterien in Adjuvans, durch den "direkt" aktivierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörper JJ316 fast vollständig unterdrückt. Der "klassische"

CD28-spezifische monoklonale Antikörper (JJ319) hatte den gegenteiligen Effekt, d. h. er verschlechterte das Krankheitsbild. Daraus ist erkennbar, auch zur Anwendung beim Menschen, daß durch die Applikation konventioneller bzw.

5 erfindungsgemäßer "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper die Immunreaktion beeinflusst werden kann, hier im Sinne einer "Immundeviation" zu TH1 bzw. TH2. Mit anderen Worten ausgedrückt, können erfindungsgemäße monoklonale Antikörper, aber auch "klassische" monoklonale

10 Antikörper, die für Human-CD28 spezifisch sind (und/oder durch Immunisierung mit T-Zellen erhältlich sind) eine Immunmodulation bewirken. Ein solcher Einsatzzweck "klassischer" monoklonaler Antikörper ist ebenfalls nicht bekannt.

15

Daher betrifft die Erfindung schließlich auch die Verwendung von gegen Human-CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern (erhältlich nach vorstehenden grundsätzlichen Verfahrensweisen, bei Immunisierung mit Human-CD28 exprimierenden

20 T-Zelllinien oder nicht-T-Zelllinien) zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulation von Immunreaktionen, und zwar Immunsuppression (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ319) oder Immunverstärkung (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ316 wie CMY-2).

25

30

## Patentansprüche:

1. Humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für  
5 Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.
- 10 2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, die erhältlich sind durch
  - A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern  
15 befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
  - B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper  
20 durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
  - 25 C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der  
30 Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.

3. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 oder 2, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch

- 5 a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHßAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
- 10 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
- c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
- 15 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- 20 f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol,
- 25 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und
- 30 h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen.

4) Hybridomzellen zur Herstellung von monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die durch folgende Verfahrensschritte erhältlich sind:

- 5 a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pHßAPr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
- 10 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
- c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
- 15 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- 20 e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
- 25 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 binden.

30

5) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit folgenden Verfahrenstufen:



- 5 A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
- 10 B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
- 15 C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzellen-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.
- 20
- 6) Verfahren nach Anspruch 5, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen in folgenden Verfahrensstufen hergestellt werden:
- 25 a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH $\beta$ APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
- 30 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,

- 5 c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfek-  
tierten Zellen,
- 5 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder  
L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und  
Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J  
und/oder L929 Zellen,
- 10 e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-  
CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929  
Zellen,
- 10 f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse  
und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der  
Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol  
und
- 15 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit  
der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybri-  
domzellen Antikörper enthalten sind, die an  
Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929  
Zellen binden.
- 20
- 7) Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der  
Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arzneimittels zur  
therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers.
- 25
- 8) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arz-  
neimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit patholo-  
gisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, insbesondere AIDS  
oder nach Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von  
30 leukämischen Erkrankungen.

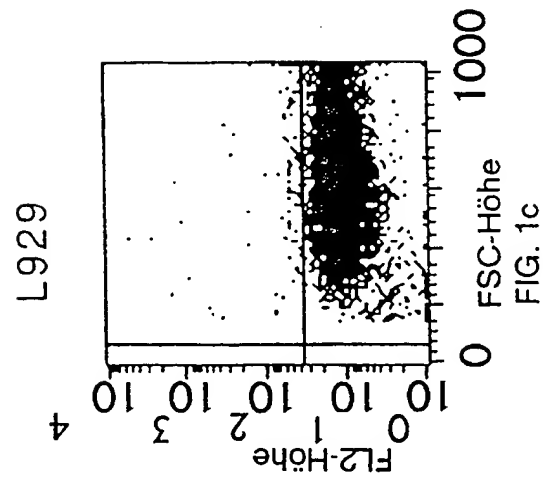
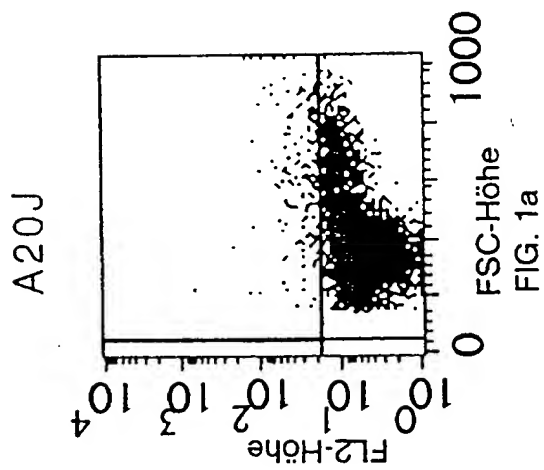
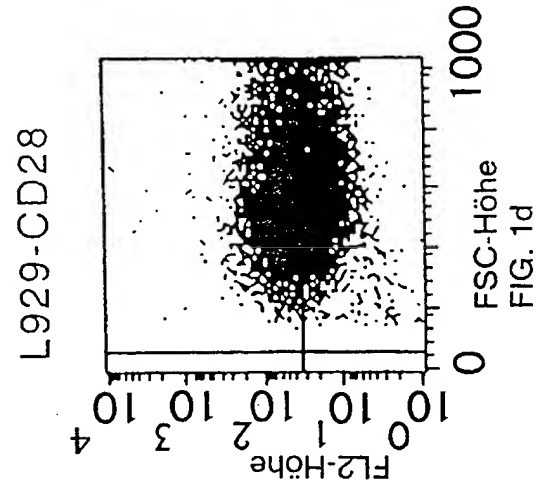
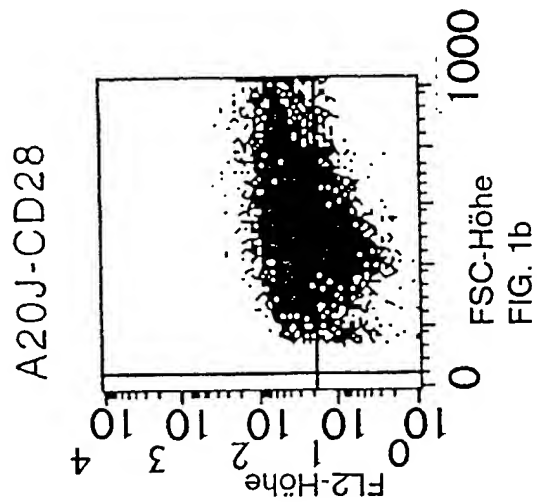
- 9) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen.

5

- 10) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine und Chemokine und ihre Rezeptoren, bei  
10 beispielsweise Autoimmunerkrankungen und AIDS.
- 11) Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der  
15 Ansprüche 1 bis 3 zur Behandlung von Krankheiten des menschlichen Körpers.
- 12) Verfahren zur therapeutischen Behandlung des menschlichen  
20 Körpers, wobei monoklonale Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3 verwendet werden.

25

30



ANTI-CD28-PE



FIG. 2A

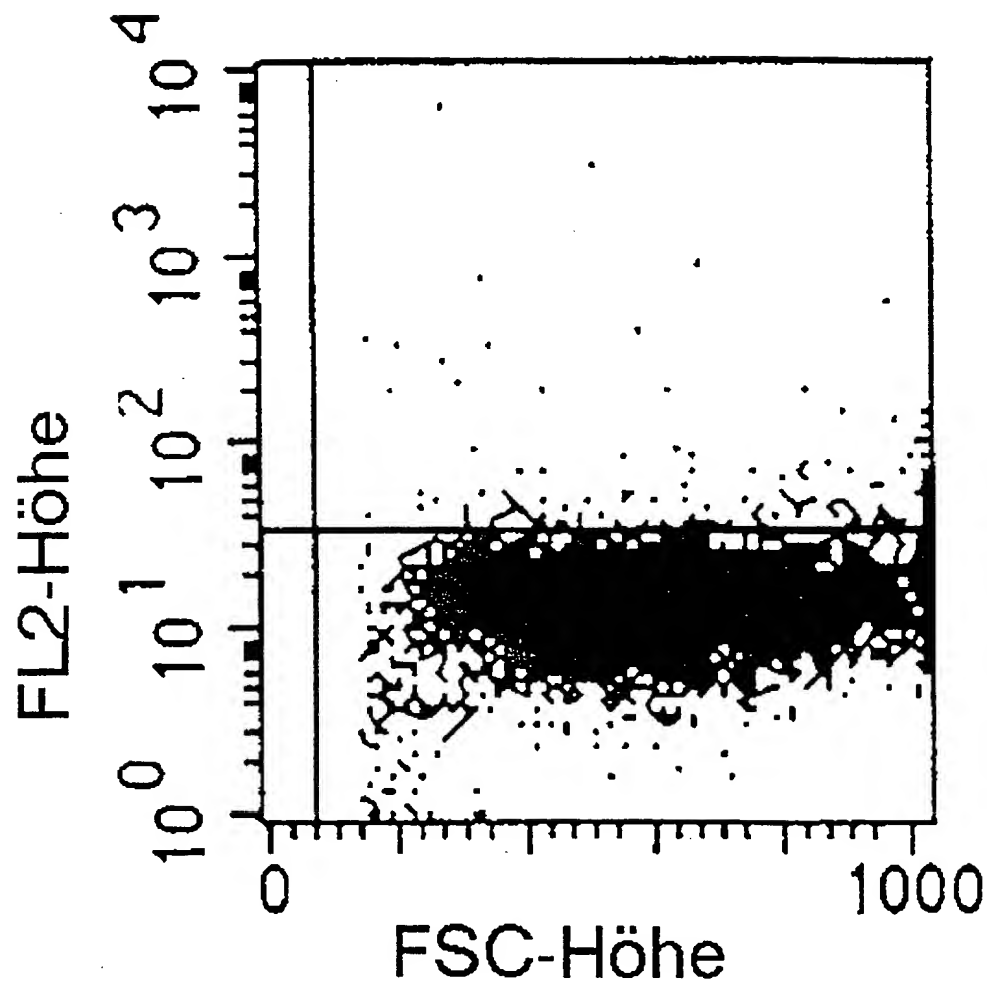


FIG. 2B

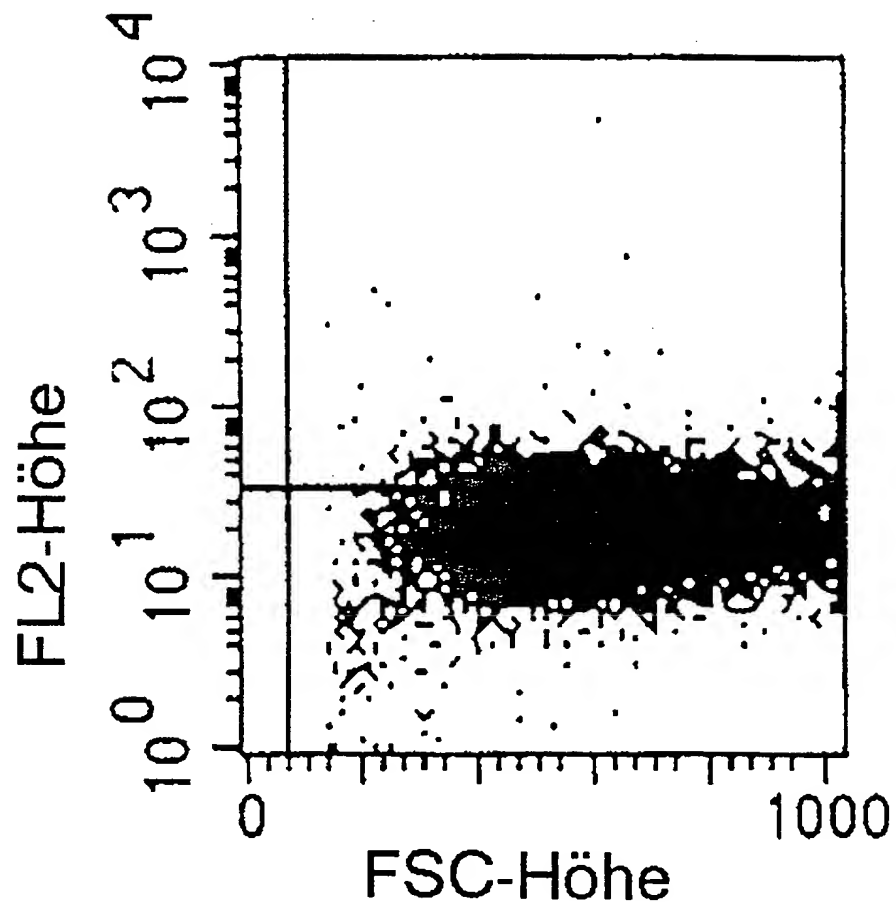


FIG. 2C

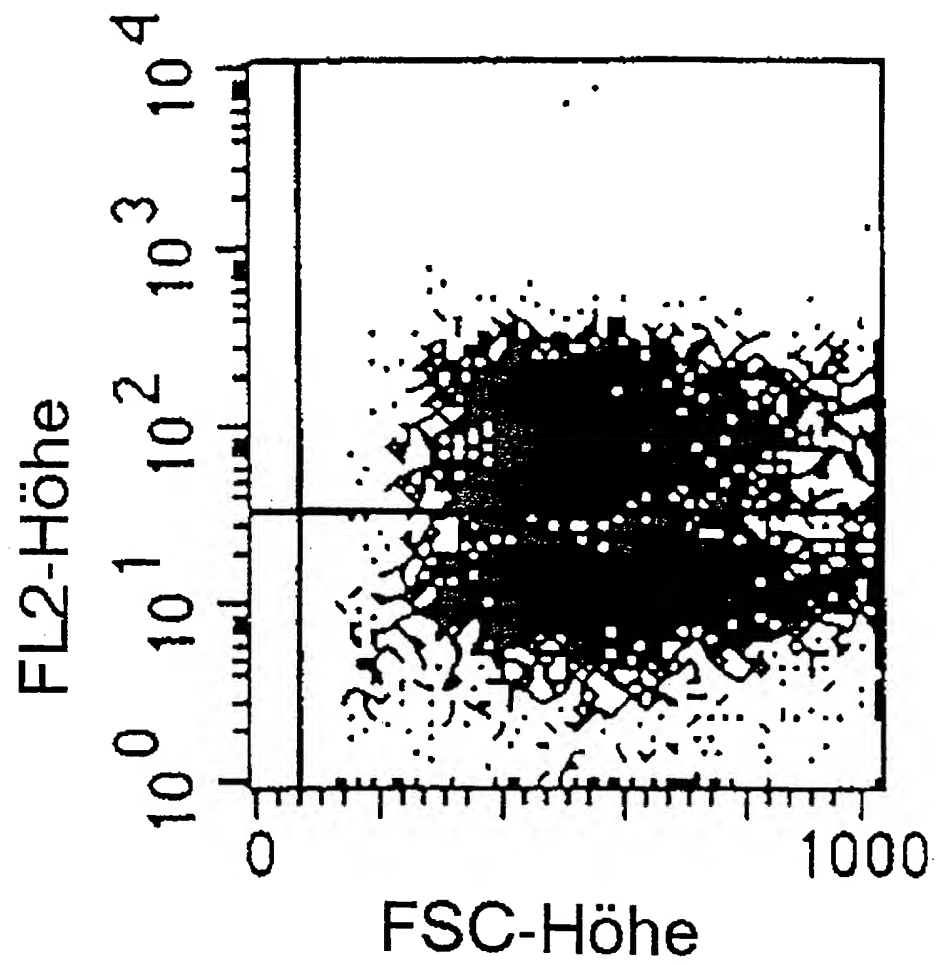


FIG. 3

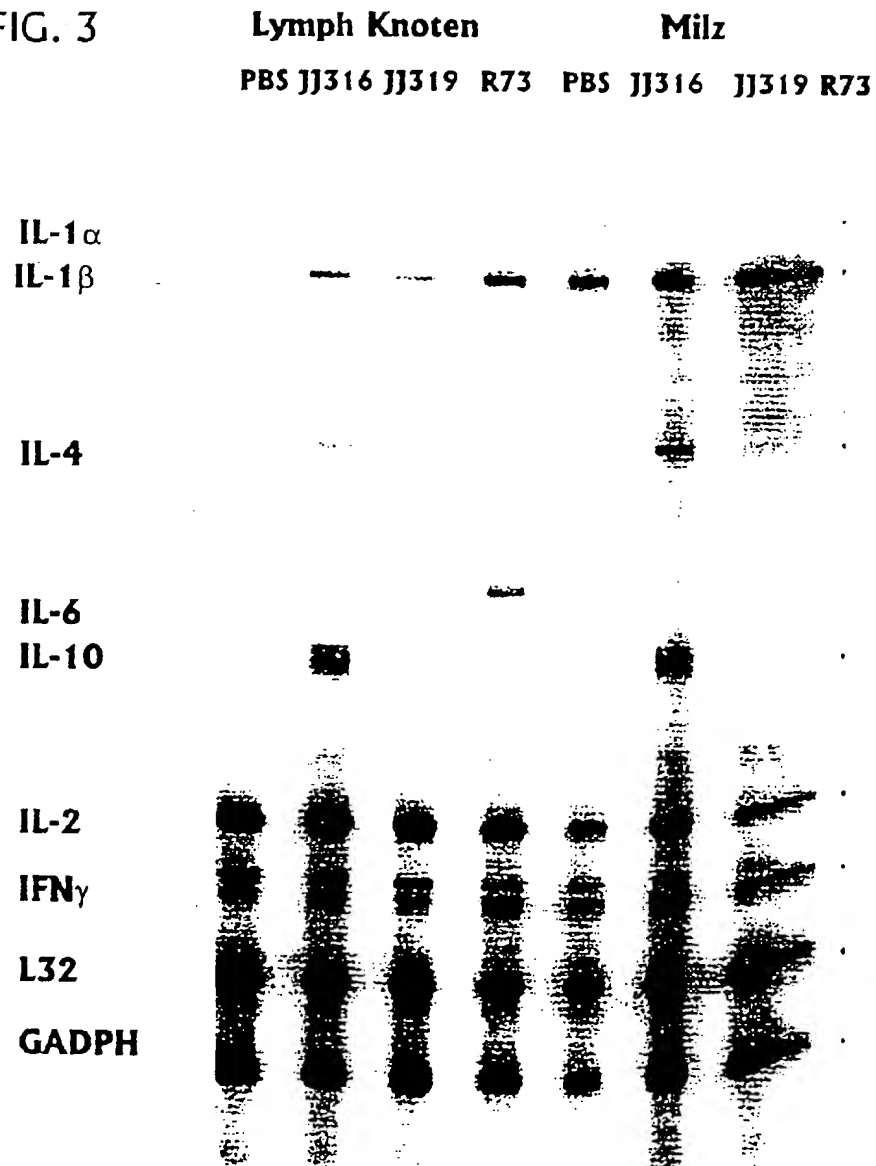




Fig 4a

JJ319

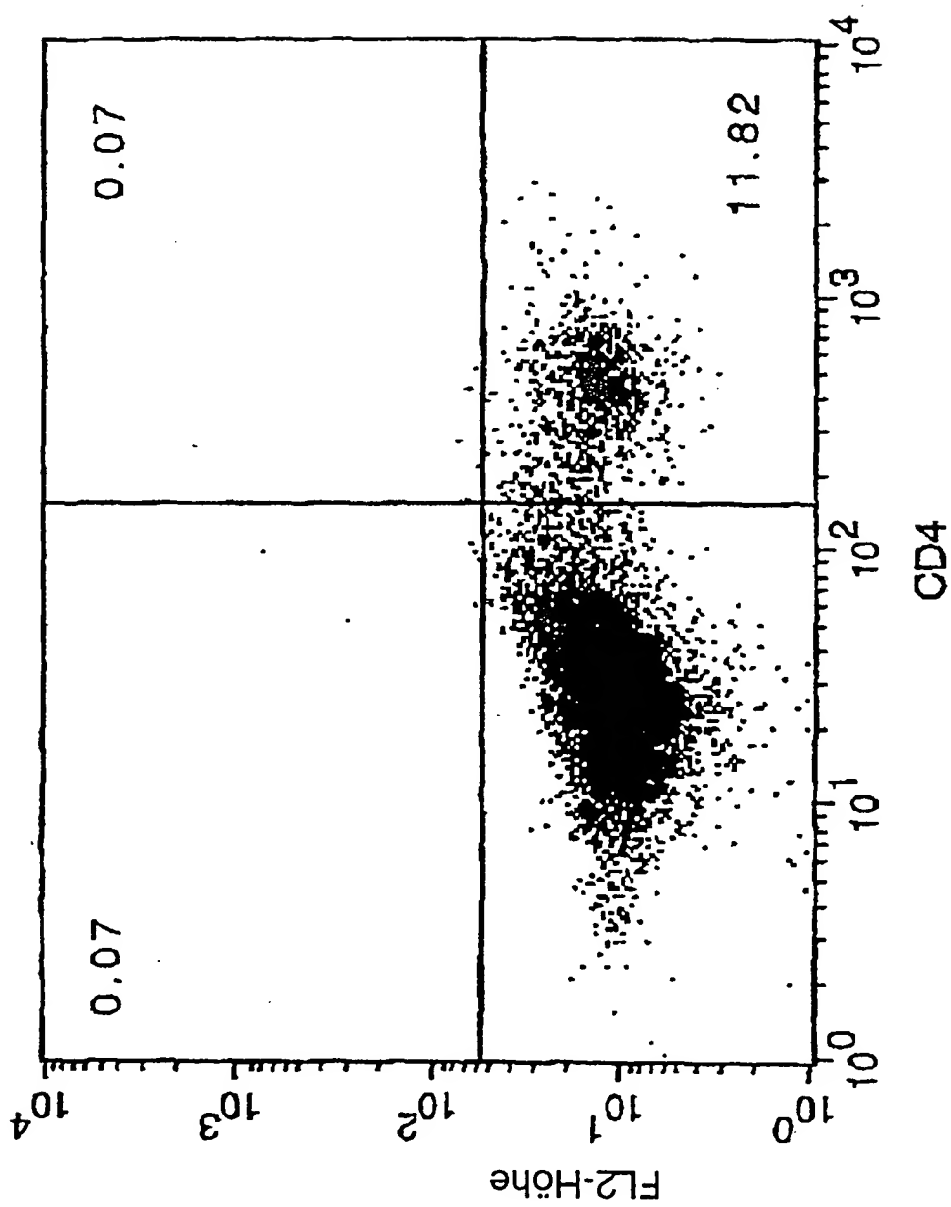
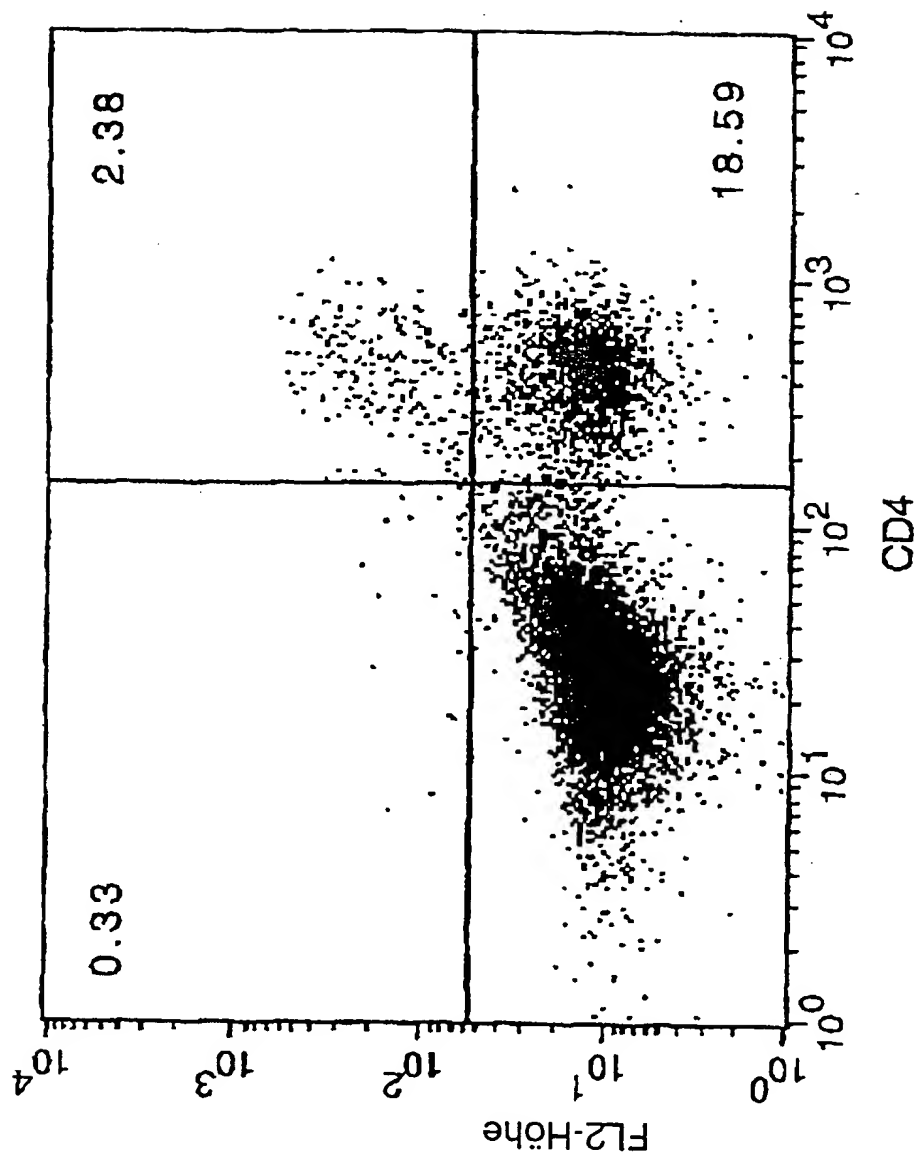


Fig 4b

JJ316



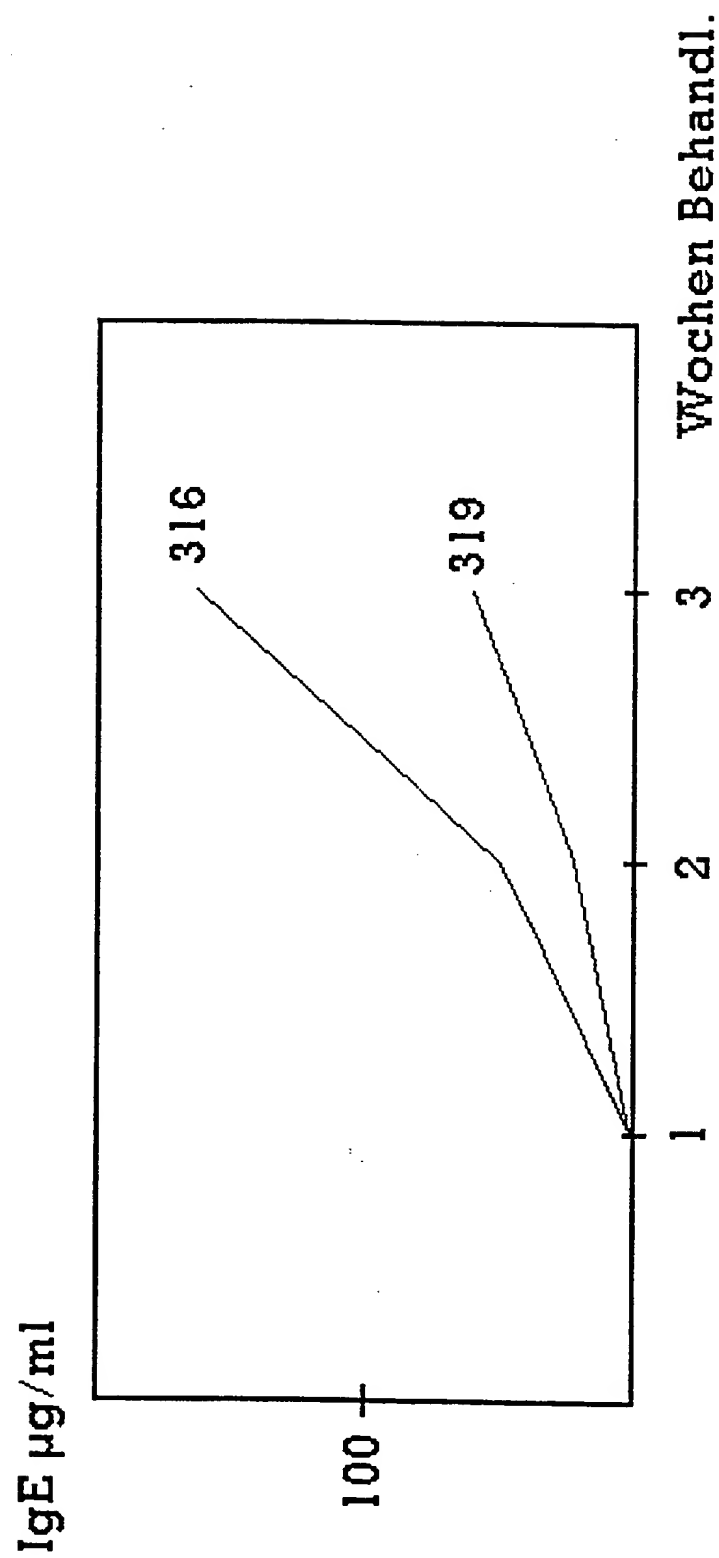
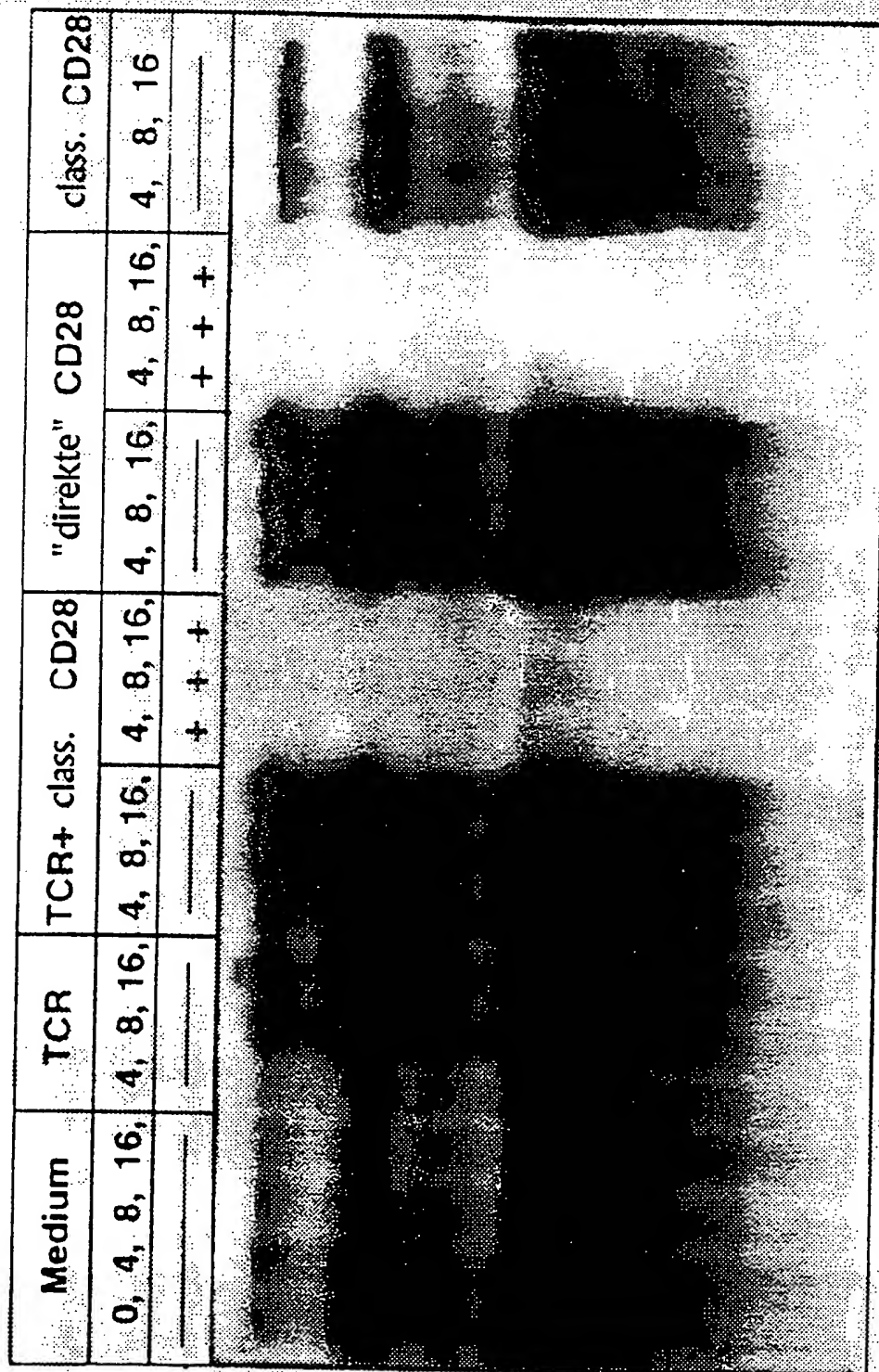


FIG. 5



c-Maf

FIG. 6

Stimuli	Medium	TCR	TCR+ class. CD28	"direkte" CD28	klass. CD28
Zeit (h)	0, 4, 8, 16,	4, 8, 16,	4, 8, 16,	4, 8, 16,	4, 8, 16,
Spez. Komp.	—	—	+	+	+

GATA 3

FIG. 7

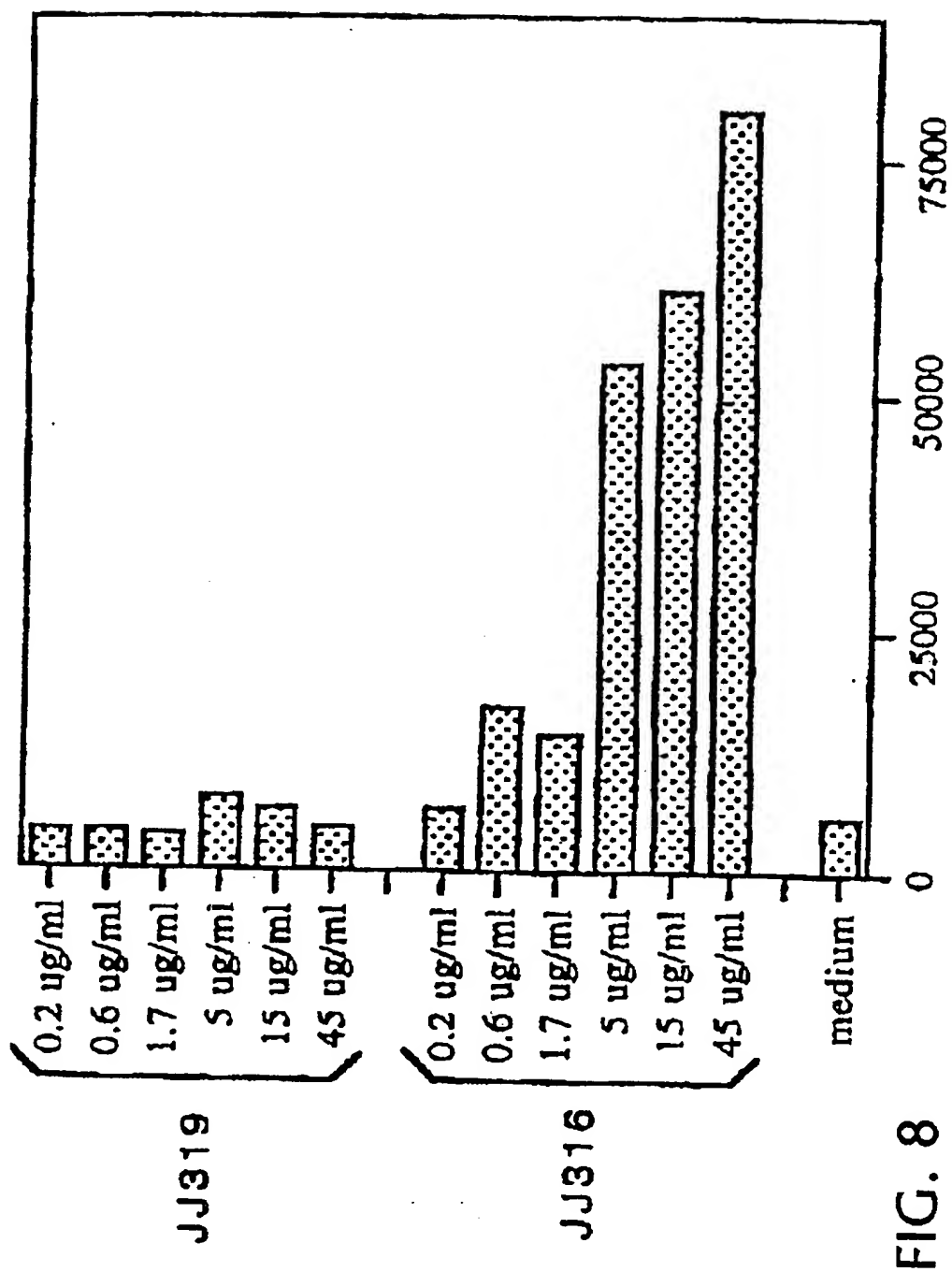


FIG. 8

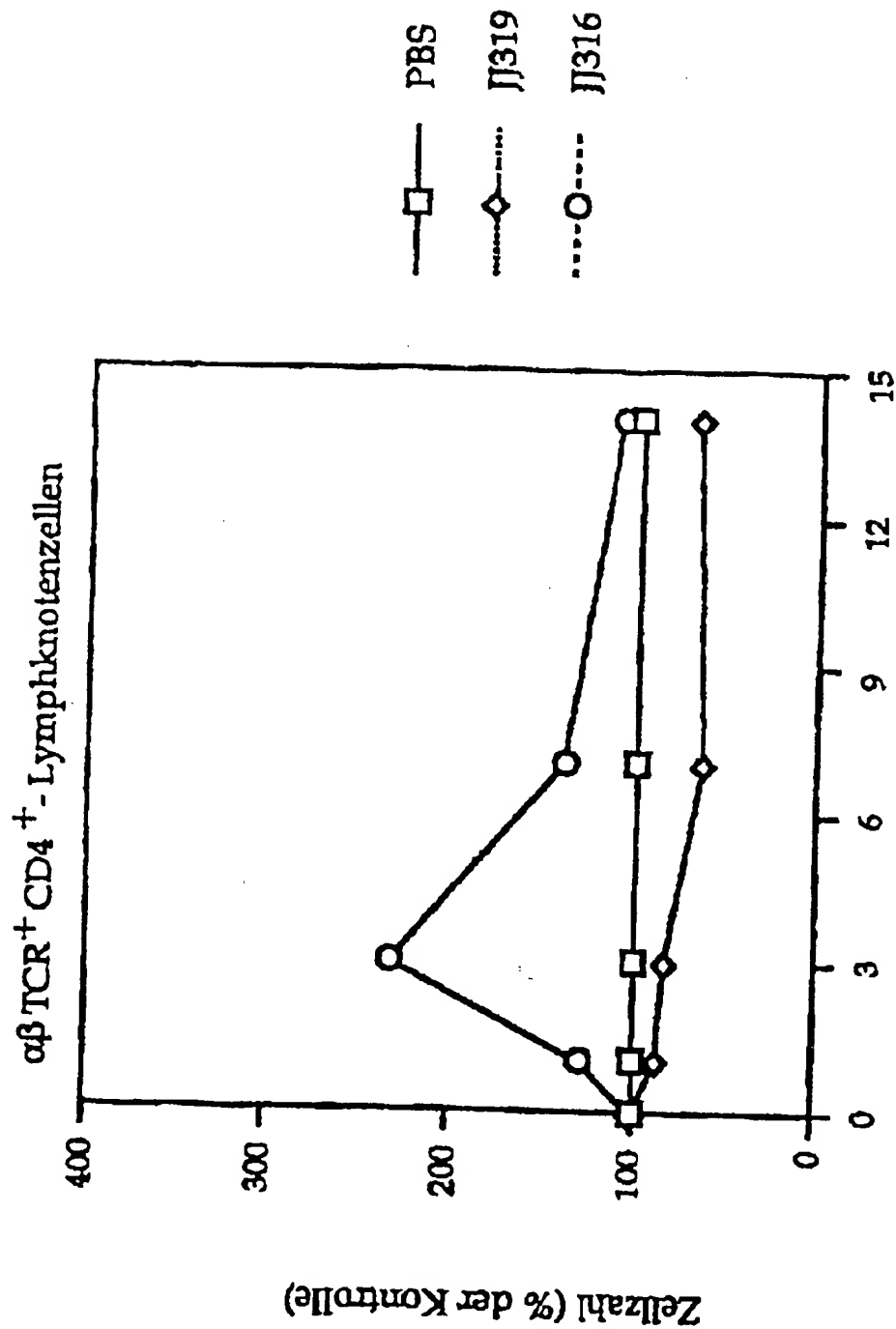


FIG. 9

Tage nach i.p. Injektion

Pfoten volumen Zunahme (%)

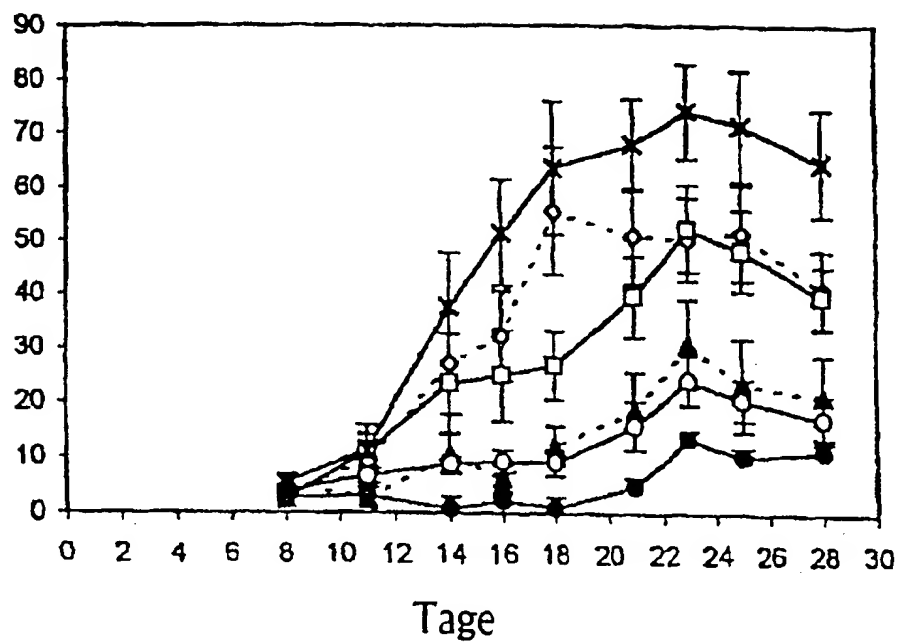
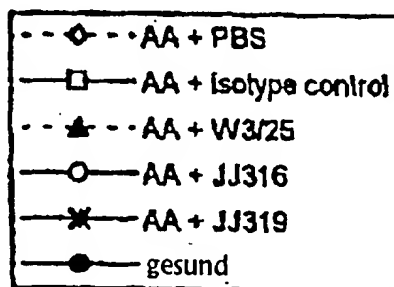


FIG. 10





## Arthritik Index

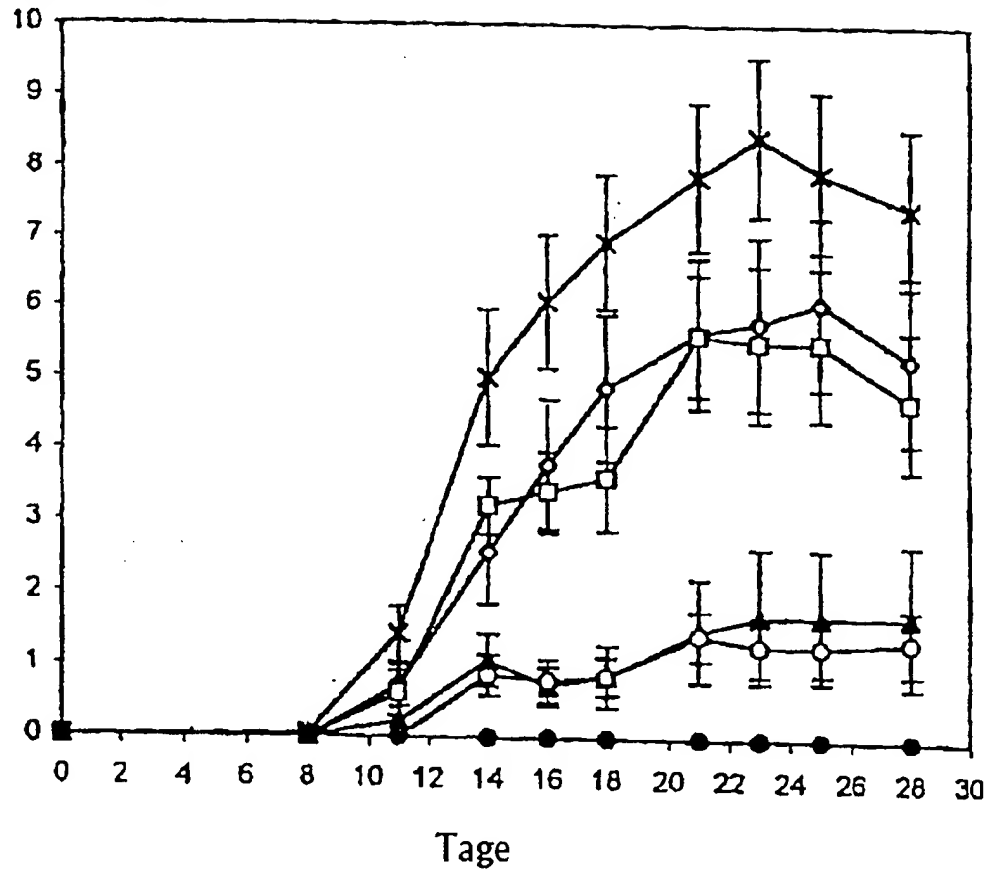


FIG. 11

